

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 06 MAY 2005

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

10 2004 017 481.4

Anmeldetag:

8. April 2004

Anmelder/Inhaber:

Evotec Technologies GmbH, 40225 Düsseldorf/DE

Bezeichnung:Mikrofluidisches System und zugehöriges Betriebs-
verfahren**Priorität:**4. Februar 2004 EP 04001031;
4. Februar 2004 EP 04001034;
9. Mai 2003 DE 203 20 397.6**IPC:**

G 01 N 15/10

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**München, den 16. April 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurke

BESCHREIBUNG

5 Mikrofluidisches System und zugehöriges Betriebsverfahren

Die Erfindung betrifft ein mikrofluidisches System, insbesondere für einen Zellsortierer, sowie ein zugehöriges Betriebsverfahren.

10

Aus MÜLLER, T. et al.: "A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles", Biosensors and Bioelectronics 14 (1999) 247-256 ist ein Untersuchungsverfahren für biologische Zellen bekannt, bei dem die zu untersuchen-
15 chenden Zellen in einem Trägerstrom eines mikrofluidischen Systems suspendiert sind und dielektrophoretisch manipuliert und sortiert werden. In dem Trägerstrom werden die zu untersuchenden Zellen zunächst durch eine trichterförmige dielektrophoretische Elektrodenanordnung (engl. "Funnel") auf-
20 gereiht und anschließend in einem dielektrophoretischen Käfig (engl. "Cage") festgehalten, um die in dem Käfig befindlichen Zellen im ruhenden Zustand untersuchen zu können, wozu mikroskopische, spektroskopische oder fluoreszenzoptische Messmethoden angewendet werden können. In Abhängigkeit von der Untersuchung der in dem dielektrophoretischen Käfig gefangenen
25 Zellen können diese anschließend sortiert werden, wozu der Bediener eine Sortiereinrichtung ansteuert, die aus einer in dem Trägerstrom stromabwärts hinter dem dielektrophoretischen Käfig angeordneten dielektrophoretischen Elektrodenanordnung
30 besteht.

Nachteilig an diesem bekannten mikrofluidischen System ist die Tatsache, dass zur Untersuchung und Sortierung unterschiedlicher Partikeltypen getrennte Untersuchungsreihen er-

forderlich sind, zwischen denen das mikrofluidische System in der Regel sogar gespült werden muss, um Partikelrückstände der vorangegangenen Untersuchungsreihe zu beseitigen.

- 5 Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, eine möglichst einfache Möglichkeit zur Untersuchung verschiedener Partikeltypen in einem mikrofluidischen System zu schaffen.

10 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der nebengeordneten Ansprüche gelöst.

(Die Erfindung umfasst die allgemeine technische Lehre, ein mikrofluidisches System mit mindestens zwei Trägerstromzuleitungen zu schaffen, über die Trägerströme mit darin suspendierten Partikeln in einen Prozessraum eingeleitet werden können, in dem die Partikel einer Untersuchung, Beobachtung, Manipulation und/oder Selektion unterzogen werden können. Dies bietet den Vorteil, dass im Rahmen einer einzigen Untersuchung ohne eine zwischenzeitliche Spülung des mikrofluidischen Systems verschiedene Partikeltypen untersucht werden können.

15
20

(In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung münden in den Prozessraum zwei Trägerstromzuleitungen, so dass zwei unterschiedliche Trägerströme mit darin suspendierten unterschiedlichen Partikeln in den Prozessraum eingeleitet werden können.

25

Die Erfindung ist jedoch hinsichtlich der Anzahl der Trägerstromzuleitungen nicht auf zwei Trägerstromzuleitungen beschränkt. Vielmehr ist auch eine größere Anzahl von Trägerstromzuleitungen möglich, falls eine größere Zahl von Partikeltypen im Rahmen einer einzigen Untersuchungsreihe untersucht werden soll.

30

Vorzugsweise ist zur Untersuchung der in den einzelnen Trägerströmen suspendierten Partikel jeweils eine Messstation vorgesehen, wobei die einzelnen Messstationen in den getrennten Trägerstromzuleitungen angeordnet sein können. Vorzugsweise sind die einzelnen Messstationen für die verschiedenen Partikel jedoch in dem gemeinsamen Prozessraum angeordnet, wobei eine getrennte Untersuchung der einzelnen Partikel dadurch ermöglicht wird, dass die einzelnen zugeführten Trägerströme in dem Prozessraum zumindest in einem stromaufwärts innerhalb des Prozessraums gelegenen Untersuchungsbereich nebeneinander verlaufen, ohne sich dort nennenswert zu vermischen.

Beispielsweise können die beiden Trägerstromzuleitungen y-förmig in den gemeinsamen Prozessraum münden und dort zunächst nebeneinander verlaufen. Die erste Messstation ist dann in dem Untersuchungsbereich des Prozessraums im Bereich des ersten Trägerstroms angeordnet, während die zweite Messstation in dem Untersuchungsbereich des Prozessraums im Bereich des zweiten Trägerstroms und bezüglich der Strömungsrichtung neben der ersten Messstation angeordnet ist.

Zur Vermeidung einer Mischung der beiden Trägerströme in dem stromaufwärts gelegenen Untersuchungsbereich des Prozessraums ist in einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung eine optionale Trennwand zwischen den beiden Trägerströmen vorgesehen, wobei die Trennwand für die Partikel undurchlässig ist. Vorzugsweise ist die Trennwand auch für die Trägerströme undurchlässig, jedoch ist es auch denkbar, dass die Trennwand nur für die Partikel undurchlässig ist, wohingegen die Trennwand für die Trägerströme durchlässig ist.

Weiterhin ist in dem gemeinsamen Prozessraum vorzugsweise ein dielektrophoretischer Feldkäfig angeordnet, um die Partikel zu fixieren. Eine derartige Fixierung der Partikel in dem Feldkäfig ist beispielsweise vorteilhaft, da die Partikel im fixierten Zustand besser untersucht werden können, wozu vorzugsweise eine dritte Messstation vorgesehen ist, welche die in dem Feldkäfig fixierten Partikel untersucht. Der Aufbau und die Funktionsweise eines Feldkäfigs ist beispielsweise in der bereits eingangs erwähnten Veröffentlichung von MÜLLER, T. et al.: "A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles" beschrieben, so dass der Inhalt dieser Veröffentlichung der vorliegenden Beschreibung in vollem Umfang zuzurechnen ist. Der im Rahmen der Erfindung verwendete Begriff eines Feldkäfigs ist jedoch allgemein zu verstehen und nicht auf die bekannten konstruktiven Gestaltungen von Feldkäfigen beschränkt. Vielmehr umfasst der Begriff eines Feldkäfigs im Sinne der Erfindung alle dielektrophoretischen Halteelemente, wie beispielsweise auch einen sogenannten "Hook".

In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung ist der Feldkäfig in dem Prozessraum bezüglich der Strömungsrichtung im Wesentlichen mittig zwischen den beiden Trägerströmen angeordnet. Ohne eine externe Ansteuerung strömen die in den beiden Trägerströmen suspendierten Partikel deshalb seitlich an dem Feldkäfig vorbei und werden von diesem nicht fixiert.

Zwischen den beiden Messstationen für die Untersuchung der verschiedenen Partikel und dem Feldkäfig ist deshalb vorzugsweise eine Selektionseinheit angeordnet, die bestimmte Partikel aus dem ersten Trägerstrom und/oder aus dem zweiten Trägerstrom selektiert und dem Feldkäfig zuführt, damit dieser die Partikel fixieren kann. Die Selektionseinheit weist vorzugsweise eine dielektrophoretische Elektrodenanordnung auf,

wie sie in der bereits eingangs erwähnten Veröffentlichung von MÜLLER, T. et al.: "A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles" beschrieben ist und dort als "Funnel" bezeichnet wird. Die Erfindung ist jedoch hinsichtlich des Aufbaus der Selektionseinheit nicht auf dieses an sich bekannte Konstruktionsprinzip beschränkt.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass die Selektionseinheit die in dem ersten Trägerstrom suspendierten Partikel und die in dem zweiten Trägerstrom suspendierten Partikel vorzugsweise unabhängig voneinander selektieren und dem Feldkäfig zuführen kann. Hierbei kann die Selektionseinheit also wahlweise die in dem ersten Trägerstrom suspendierten Partikel oder die in dem zweiten Trägerstrom suspendierten Partikel selektieren und dem Feldkäfig zuführen. Die Auswahl der zu selektierenden Partikel kann hierbei in Abhängigkeit von dem Untersuchungsergebnis in den beiden Messstationen erfolgen. Beispielsweise kann ein in dem ersten Trägerstrom suspendierter Partikel selektiert und dem Feldkäfig zugeführt werden, wenn die vorangegangene Untersuchung in der ersten Messstation ein bestimmtes Untersuchungsergebnis erbracht hat. Entsprechend kann ein in dem zweiten Trägerstrom suspendierter Partikel selektiert und dem Feldkäfig zugeführt werden, wenn die vorangegangene Untersuchung dieses Partikels in der zweiten Messstation ein bestimmtes Untersuchungsergebnis erbracht hat.

Es ist jedoch im Rahmen der Erfindung auch möglich, dass die in den beiden Trägerströmen suspendierten Partikel gemeinsam selektiert und zur Paarbildung in dem Feldkäfig zusammengeführt werden.

Ferner kann in einer oder mehreren Trägerstromzuleitungen, in dem Prozessraum und/oder in einer oder mehreren Ausgangsleitungen eine Zentriereinheit angeordnet sein, welche die in

dem Trägerstrom suspendierten Partikel zentriert. Auf diese Weise wird vorteilhaft eine Partikelablagerung und -anhaftung an der Innenwand der Trägerstromzuleitungen, des Prozessraums bzw. der Ausgangsleitung verhindert. Eine derartige Zentrier-

5 einheit weist vorzugsweise eine dielektrophoretische Elektrodenanordnung auf, wie sie beispielsweise in der bereits eingangs erwähnten Veröffentlichung von MÜLLER, T. et al.: "A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles" beschrieben ist und dort als "Funnel"

10 bezeichnet wird. Der Inhalt dieser Veröffentlichung ist deshalb der vorliegenden Beschreibung hinsichtlich der Gestaltung der Zentriereinheit zuzurechnen.

Darüber hinaus kann in einer oder mehreren Trägerstromzuleitungen, in dem Prozessraum oder in einer oder mehreren Aus-

15 gangsleitungen auch eine Halteeinheit angeordnet sein, welche die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel vorübergehend festhält. Am Eingang des erfindungsgemäßen mikrofluidischen Systems kann eine derartige Halteeinheit dann stets einen be-

20 stimmten Vorrat an Partikeln bereithalten. Am Ausgang des mikrofluidischen System ermöglicht eine derartige Halteeinheit ebenfalls eine vorübergehende Fixierung der Partikel, was beispielsweise bei einem Batch-Betrieb sinnvoll sein kann. Vorzugsweise weist eine derartige Halteeinheit eine

25 dielektrophoretische Elektrodenanordnung auf, die an sich bekannt ist und üblicherweise als "Hook" bezeichnet wird.

Weiterhin münden aus dem Prozessraum vorzugsweise mehrere Trägerstromausgangsleitungen aus, wobei die Partikel auf die

30 verschiedenen Trägerstromausgangsleitungen sortiert werden können. Hierzu ist vorzugsweise eine Sortiereinheit vorgesehen, die vorzugsweise in dem stromabwärts gelegenen Bereich des Prozessraums angeordnet ist und die Sortierung auf die verschiedenen Trägerstromausgangsleitungen vornimmt. Die Sor-

tiereinheit weist vorzugsweise eine dielektrophoretische Elektrodenanordnung auf, wie sie beispielsweise in der bereits eingangs erwähnten Veröffentlichung von MÜLLER, T. et al.: "A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles" beschrieben ist und dort als "Switch" bezeichnet wird. Die Erfindung ist jedoch hinsichtlich des Aufbaus und der Funktionsweise der Sortiereinheit nicht auf dieses an sich bekannte Konstruktionsprinzip beschränkt.

10

(Die Ansteuerung der Sortiereinheit zur Sortierung der Partikel auf die verschiedenen Trägerstromausgangsleitungen erfolgt vorzugsweise in Abhängigkeit von der Untersuchung der Partikel in dem Prozessraum. Hierbei kann die Sortierung ausschließlich in Abhängigkeit von der Untersuchung der in dem Feldkäfig fixierten Partikel erfolgen. Es ist jedoch auch möglich, dass die Sortierung nur in Abhängigkeit von der Untersuchung der Partikel in den getrennten Trägerströmen erfolgt. Darüber hinaus kann die Sortierung auch in Abhängigkeit von sämtlichen Untersuchungen erfolgen, die in dem Prozessraum durchgeführt werden.

20

(Vorzugsweise mündet hierbei eine der Trägerstromausgangsleitungen in einer Strömungslinie hinter dem Feldkäfig aus dem Prozessraum aus, so dass die von dem Feldkäfig freigegebenen Partikel ohne eine aktive Ansteuerung der Sortiereinheit über diese Trägerstromausgangsleitung abgeführt werden. Die anderen Trägerstromausgangsleitungen münden dagegen vorzugsweise gegenüber der Strömungslinie hinter dem Feldkäfig seitlich versetzt aus dem Prozessraum aus, so dass eine aktive Ansteuerung der Sortiereinheit erforderlich ist, um die von dem Feldkäfig freigegebenen Partikel über diese seitlich versetzten Trägerstromausgangsleitung abzuführen.

25

30

Die in der Strömungslinie hinter dem Feldkäfig ausmündende Trägerstromausgangsleitung wird vorzugsweise zur Abführung solcher Partikel benutzt, die in den Trägerströmen häufig vorkommen, wohingegen die seitlich versetzten Trägerstromausgangsleitungen vorzugsweise zur Abführung von Partikeln benutzt werden, die in den Trägerströmen seltener vorkommen. Dies ist vorteilhaft, da die Sortiereinheit auf diese Weise seltener aktiv angesteuert werden muss.

10 Ferner ist zu erwähnen, dass die Erfindung nicht nur das vorstehend beschriebene mikrofluidische System als Einzelteil, wie beispielsweise als Chip, umfasst, sondern auch einen Zellsortierer und einen Zellfusionierer mit einem derartigen mikrofluidischen System betrifft.

15 Hinsichtlich der Einzelheiten der Zellfusion wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf die Patentanmeldung DE 198 59 459 A1 verwiesen, wobei der Inhalt dieser Patentanmeldung der vorliegenden Beschreibung hinsichtlich der Zellfusion zuzurechnen ist.

20 In einer Variante der Erfindung erfolgt in dem erfindungsgemäßen mikrofluidischen System zuerst eine Zellfusion und anschließend eine Untersuchung des entstandenen Zellpaares. In Abhängigkeit von dem Ergebnis dieser Untersuchung erfolgt dann eine Sortierung auf eine von mehreren Ausgangsleitungen.

Darüber hinaus umfasst die Erfindung auch ein entsprechendes Betriebsverfahren, das bereits vorstehend beschrieben wurde.

30 Weiterhin ist zu erwähnen, dass der im Rahmen der Erfindung verwendete Begriff eines Partikels allgemein zu verstehen ist und nicht auf einzelne biologische Zellen beschränkt ist. Vielmehr umfasst dieser Begriff auch synthetische oder biolo-

gische Partikel, wobei sich besondere Vorteile ergeben, wenn die Partikel biologische Materialien, also beispielsweise biologische Zellen, Zellgruppen, Zellbestandteile oder biologisch relevante Makromoleküle, jeweils ggf. im Verbund mit anderen biologischen Partikeln oder synthetischen Trägerpartikeln umfassen. Synthetische Partikel können feste Partikel, flüssige, vom Suspensionsmedium abgegrenzte Teilchen oder Mehrphasenpartikel umfassen, die gegenüber dem Suspensionsmedium in dem Trägerstrom eine getrennte Phase bilden.

Schließlich ist der im Rahmen der Erfindung verwendete Begriff eines mikrofluidischen Systems allgemein zu verstehen und bedeutet vorzugsweise, dass die Abmessungen der Trägerstromzuleitungen, des Prozessraums und der Trägerstromausgangsleitungen so klein sind, dass der Trägerstrom laminar ist, ohne dass sich Wirbel bilden. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass die Breite der Trägerstromzuleitungen, des Prozessraums und der Trägerstromausgangsleitungen vorzugsweise im Bereich eines Mehrfachen (z.B. das 10- bis 400-fache) des Partikeldurchmessers liegen.

Andere vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen gekennzeichnet oder werden nachstehend zusammen mit der Beschreibung des bevorzugten Ausführungsbeispiels der Erfindung anhand der einzigen Figur näher erläutert. Es zeigen:

Figur 1 ein Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen mikrofluidischen System in einem Sortierchip eines Zellsortierers sowie

Figur 2 ein alternatives Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen mikrofluidischen Systems zur Zellfusion.

Hierbei münden zwei Trägerstromzuleitungen 1, 2 in einen Prozessraum 3, wobei über die beiden Trägerstromzuleitungen 1, 2 jeweils suspendierte Partikel 4, 5 zugeführt werden.

5 In den beiden Trägerstromzuleitungen 1, 2 ist jeweils eine trichterförmige Elektrodenanordnung 6, 7 angeordnet, um die in den Trägerströmen der beiden Trägerstromzuleitungen 1, 2 suspendierten Partikel 4, 5 zu zentrieren. Der Aufbau und die Funktionsweise der Elektrodenanordnungen 6, 7 ist an sich be-
10 kannt und beispielsweise in der bereits eingangs erwähnten Veröffentlichung MÜLLER, T. et al.: "A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles" beschrieben.

15 In dem Prozessraum 3 befindet sich in einem stromaufwärts gelegenen Untersuchungsbereich an der Mündungsstelle der beiden Trägerstromzuleitungen 1, 2 eine Trennwand 8, so dass die in den Trägerströmen der beiden Trägerstromzuleitungen 1, 2 suspendierten Partikel 4, 5 in dem Prozessraum 3 zunächst paral-
20 lel nebeneinander und getrennt voneinander geführt werden. Die Trennwand 8 ist deshalb für die beiden Trägerströme und für die darin suspendierten Partikel 4, 5 undurchlässig.

Im Bereich der Trennwand 8 befinden sich in dem Prozessraum 3
25 zwei Messstationen 9, 10, um die suspendierten Partikel 4, 5 während des Vorbeiströmens einer Voruntersuchung zu unterziehen. Die Voruntersuchung kann in herkömmlicher Weise erfolgen und beispielsweise eine Durchlichtmessung oder eine fluoreszenzoptische Untersuchung umfassen.

30

Stromabwärts hinter den beiden Messstationen 9, 10 befindet sich in dem Prozessraum 3 eine trichterförmige Elektrodenanordnung 11, welche die in den beiden Teilströmen beiderseits der Trennwand 8 suspendierten Partikel 4, 5 zentriert und ei-

nem dielektrophoretischen Feldkäfig 12 zuführt, der die Partikel 4, 5 für eine Untersuchung in einer weiteren Messstation 13 fixieren kann. Der Aufbau und die Funktionsweise der Elektrodenanordnung 11 ist ebenfalls an sich bekannt und in der bereits vorstehend erwähnten Veröffentlichung von MÜLLER, T. et al.: "A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles" beschrieben. Die Elektrodenanordnung 11 weist jedoch in diesem Ausführungsbeispiel zwei Schenkel auf, die getrennt und unabhängig voneinander schaltbar sind.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass die Untersuchung in der Messstation 13 ebenfalls in herkömmlicher Weise erfolgen kann und beispielsweise eine Durchlichtmessung oder eine Fluoreszenzmessung umfasst.

Die Fixierung der Partikel 4, 5 in dem Feldkäfig 12 ist vorteilhaft, da die Partikel 4, 5 im ruhenden Zustand genauer untersucht werden können.

Hinter jeder der beiden Messstationen 9, 10 und vor der Elektrodenanordnung 11 kann zusätzlich jeweils ein Retardierungselement (Halteelemente) angeordnet sein, wobei diese beiden Retardierungselemente in der Zeichnung nicht dargestellt sind. Die Elektrodenanordnung 11 würde hierbei nur angesteuert, wenn die beiden Retardierungselemente wirklich Partikel enthalten, wohingegen eine Ansteuerung der Elektrodenanordnung überflüssig ist, wenn sich in den Retardierungselementen keine Partikel befinden.

Wenn der Partikel 4 in der Messstation 9 positiv bewertet wird und von der Elektrodenanordnung 11 in den Feldkäfig 12 gelenkt wird, sind die Eintrittselektroden (oder besser gesagt die stromaufwärts gelegenen Elektroden) des Feldkä-

figs 12 ausgeschaltet, und die stromabwärts gelegenen Elektroden angeschaltet. Der Partikel 4 wird so von den angeschalteten Elektroden an einer Bewegung mit der Strömung gehindert und praktisch gehalten. Erst wenn der weitere Partikel 5 nach einer positiven Bewertung in der Messstation 10 von der Elektrodenanordnung 11 in den Feldkäfig 12 abgelenkt wird, werden auch die stromaufwärts gelegenen Elektroden angeschaltet.

Alternativ besteht auch folgende Möglichkeit: Alle Elektroden des Feldkäfigs 12 sind angeschaltet und bilden für den Partikel 4 eine Barriere, die den Partikel 4 an einer Weiterbewegung hindert. Erst wenn der Partikel 5 auch in Richtung des Feldkäfigs 12 abgelenkt wurde, werden alle Elektroden kurz ausgeschaltet, so dass beide Partikel 4, 5 in den Feldkäfig gelangen können. Unmittelbar danach werden sie wieder angeschaltet.

Stromabwärts hinter dem dielektrophoretischen Feldkäfig 12 befindet sich eine weitere Elektrodenanordnung 14, welche die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel 4, 5 nach der Freigabe durch den Feldkäfig 12 in Abhängigkeit von dem Ergebnis der Untersuchung in der Messstation 13 einer von drei Ausgangsleitungen 15, 16, 17 zuführt.

Die Ausgangsleitungen 15, 17 dienen zur Abführung der negativ selektierten Partikel 4, 5, während die Ausgangsleitung 16 der Weiterführung der positiv selektierten Partikel dient. Die Ausgangsleitung 16 mündet hierbei in der Strömungslinie hinter dem Feldkäfig 12 aus dem Prozessraum 3 aus, während die Ausgangsleitungen 15, 17 gegenüber der Strömungslinie hinter dem Feldkäfig 12 seitlich versetzt aus dem Prozessraum 3 ausmünden. Dies hat zur Folge, dass die von dem Feldkäfig 12 freigegebenen Partikel 4, 5 ohne eine äußere Kraft-

einwirkung in die Ausgangsleitung 16 gelangen. Die Elektrodenanordnung 14 muss also aktiv angesteuert werden, wenn die Partikel 4, 5 in die Ausgangsleitungen 15, 17 für die negativ selektierten Partikel 4, 5 befördert werden sollen, wohingegen keine Ansteuerung für die positiv selektierten Partikel 4, 5 erfolgt. Diese Anordnung eignet sich deshalb besonders bei solchen Untersuchungen, bei denen nur wenige der Partikel 4, 5 negativ selektiert werden.

10 Das in Figur 2 dargestellte Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen mikrofluidischen Systems stimmt weitgehend mit dem vorstehend beschriebenen Ausführungsbeispiel überein, so dass ergänzend auf die vorstehende Beschreibung verwiesen wird, wobei im Folgenden für entsprechende Bauteile dieselben
15 Bezugszeichen verwendet werden.

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht darin, dass die Partikel 4, 5 in dem mikrofluidischen System zu Hybridpaaren fusioniert werden sollen, wobei über die Trägerstromzuleitungen 1, 2 unterschiedliche Typen von Partikeln 4, 5 zugeführt werden.
20

Der Feldkäfig 12 ist deshalb in diesem Ausführungsbeispiel etwas anders gestaltet und vereinigt die Funktionen einer Zentriereinheit (engl. "Funnel") und eines Feldkäfigs (engl. "Cage").
25

Weiterhin bestehen die trichterförmigen Elektrodenanordnungen 6, 7 in den beiden Trägerstromzuleitungen 1, 2 hierbei jeweils aus mehreren trichterförmigen Elektroden, die galvanisch miteinander verbunden sind und gemeinsam angesteuert werden. Dies bietet den Vorteil einer verbesserten Zentrierwirkung.
30

Darüber ist in den beiden Trägerstromzuleitungen 1, 2 stromaufwärts vor den trichterförmigen Elektrodenanordnungen 6, 7 jeweils eine Halteeinheit 18, 19 angeordnet, die aus einer dielektrophoretischen Elektrodenanordnung besteht. Die Halteeinheiten 18, 19 können die über die Trägerstromzuleitungen 6, 7 zugeführten Partikel 4, 5 zwischenspeichern, so dass am Eingang des mikrofluidischen Systems stets eine ausreichende Anzahl der Partikel 4, 5 für eine Paarbildung zur Verfügung steht. Die Elektrodenanordnungen der beiden Halteeinheiten 18, 19 bestehen hierbei jeweils aus zwei Zick-Zack-förmigen Elektroden, die in Strömungsrichtung hintereinander angeordnet sind, wobei die beiden Zick-Zack-förmigen Elektroden der Halteeinheiten 18, 19 galvanisch miteinander verbunden sind und gemeinsam angesteuert werden.

15

Die Halteeinheit 18 und die Elektrodenanordnung 6 in der Trägerstromzuleitung 1 werden hierbei zeitlich koordiniert mit der Halteeinheit 19 und der Elektrodenanordnung 7 in der Trägerstromzuleitung 2 angesteuert. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass immer eine ausreichende Anzahl der Partikel 4, 5 beider Typen für die Paarbildung angesammelt wird. Darüber hinaus wird durch die zeitlich koordinierte Ansteuerung auch verhindert, dass sich die Partikel 4, 5 bei einer ungeeigneten Zellkonzentration zu stark verklumpen.

25

Durch die trichterförmigen Elektrodenanordnungen 6, 7 werden die Partikel 4, 5 von den Kanalrändern hin zur Kanalmitte geführt und zugleich auch in z-Ebene angehoben, was zu einem verbesserten Partikelfluss beiträgt und verhindert, dass sich Zellen oder Aggregate an der Glasoberfläche leicht anhaften und zu einem Partikelstau führen. Die trichterförmigen Elektrodenanordnungen 6, 7 sind hierbei so angeordnet, dass beide Partikelströme sich nicht unkontrolliert vermischen.

30

Ferner ist in der Ausgangsleitung 16 eine weitere Halteeinheit 20 angeordnet, die ebenfalls aus einer dielektrophoretischen Elektrodenanordnung besteht und ähnlich aufgebaut ist wie die Halteeinheiten 6, 7. Die Halteeinheit 20 ermöglicht es, ein in dem Feldkäfig 12 gebildetes Zellpaar vor der Weitergabe in der Ausgangsleitung 16 festzuhalten. Dies ist insbesondere bei einem batchweisen Betrieb des Mikrosystems vorteilhaft.

10 Im Folgenden wird nun das Betriebsverfahren des in Figur 2 dargestellte Mikrosystems beschrieben.

(
 15 Passieren die Partikel 4, 5 der beiden Zelltypen unabhängig von einander die Messstationen 9, 10, werden ihre optischen Eigenschaften registriert (z.B. Größe, Fluoreszenz, Durchlichteigenschaft, Phasenkontrast, Einzeln/Aggregat, Abstand zur nächsten Zelle). Das Ein- bzw. Freischalten des Feldkäfigs 12 wird über einen detektionsseitigen Trigger ausgelöst.

20 Erfüllt der jeweilige Partikel 4, 5 die ausgesuchten Zielkriterien nicht, werden die unabhängig zu schaltenden Schenkel der trichterförmigen Elektrodenanordnung 11 ausgeschaltet und der negativ evaluierte Partikel 4, 5 gelangt nach Passieren der Elektrodenanordnung 14 in die Ausgangsleitungen 15, 17.
 25 Alternativ können anstelle der trichterförmigen Elektrodenanordnung 11 (engl. "Funnel") zwei sogenannte Fast-Switches eingesetzt werden.

30 Ist einer der Partikel 4, 5 positiv evaluiert, werden die Einzelschenkel der Elektrodenanordnung 11 eingeschaltet und der Partikel 4, 5 gelangt vor den Feldkäfig 12, welcher der Paarbildung dient. Dies kann anstelle des Feldkäfigs 12 ein sogenannter "Hook" sein oder ein sogenannter "Hohlkammerfunnel" (auch mit mehreren Taschen, hier nicht gezeigt).

Ist durch die optische Detektion sichergestellt, dass die Paarbildung erfolgte, kann das Zellpaar das System passieren und wird in der mittleren Ausgangsleitung 16 ausgespült, bzw. bei batchweisem Abarbeiten in der Halteeinheit 20 zwischengespeichert.

Ansonsten wird durch die Sperrfunktion der pfeilförmigen Elektrodenanordnung 14 die mittlere Ausgangsleitung 16 elektrisch verschlossen.

Anspruchsvoller ist es, wenn die beiden Partikel 4, 5 erst in dem Feldkäfig 12 gezielt vereint werden sollen. Dann ist es sinnvoll, nach dem passieren der trichterförmigen Elektrodenanordnung 11 durch den positiv bewerteten Partikel 4, 5 den Partikel 4, 5 vor dem eingeschalteten Feldkäfig 12 zu halten. Wenn der zweite Partikel 4, 5 vor den Feldkäfig 12 gelangt, wird der Feldkäfig 12 kurz aus- und dann wieder angeschaltet. Das Partikelpaar ist dann gefangen. Alternativ ist es auch möglich zunächst nur den Feldkäfig 12 im Fangmodus zu betreiben. Hier sind die Strömungsabgewandten Elektrodenpaare angeschaltet, die in Strömung liegenden Bereich sind ausgeschaltet. Einer der Partikel 4, 5 wird im Käfigbereich gehalten. Erst wenn der zweite Partikel 4, 5 in den Zentralbereich des Feldkäfigs 12 gelangt, wird auch die strömungszugewandte Seite über ein Triggersignal angeschaltet

Die Erfindung ist nicht auf das vorstehend beschriebene bevorzugte Ausführungsbeispiel beschränkt. Vielmehr ist eine Vielzahl von Varianten und Abwandlungen möglich, die ebenfalls von dem Erfindungsgedanken Gebrauch machen und deshalb in den Schutzbereich fallen.

* * * * *

16331

Bezugszeichenliste:

- 1 Trägerstromzuleitung
- 2 Trägerstromzuleitung
- 3 Prozessraum
- 4 Partikel
- 5 Partikel
- 6 Elektrodenanordnung
- 7 Elektrodenanordnung
- 8 Trennwand
- 9 Messstation
- 10 Messstation
- 11 Elektrodenanordnung
- 12 Feldkäfig
- 13 Messstation
- 14 Elektrodenanordnung
- 15 Ausgangsleitung
- 16 Ausgangsleitung
- 17 Ausgangsleitung
- 18 Halteeinheit
- 19 Halteeinheit
- 20 Halteeinheit

* * * * *

ANSPRÜCHE

- 5 1. Mikrofluidisches System, insbesondere in einem Zellsortierer, mit
- einer ersten Trägerstromzuleitung (1) zur Zuführung eines ersten Trägerstroms mit darin suspendierten Partikeln (4),
 - einer ersten Trägerstromausgangsleitung (15) zum Abführen
 - 10 mindestens eines Teils des Trägerstroms mit den darin suspendierten Partikeln (4),
 - einem Prozessraum (3) zur Untersuchung, Beobachtung, Manipulation und/oder Selektion der Partikel (4), wobei die erste Trägerstromzuleitung (1) in den Prozessraum (3) ein-
 - 15 mündet, während die erste Trägerstromausgangsleitung (15) aus dem Prozessraum (3) ausmündet,

gekennzeichnet durch

- mindestens eine zweite Trägerstromzuleitung (2) zur Zuführung eines zweiten Trägerstroms mit darin suspendierten
- 20 Partikeln (5), wobei die zweite Trägerstromzuleitung (2) ebenfalls in den Prozessraum (3) einmündet.

2. Mikrofluidisches System nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch**

- 25 - eine erste Messstation (9) zur Untersuchung der in dem ersten Trägerstrom suspendierten Partikel (4) und
- eine zweite Messstation (10) zur Untersuchung der in dem zweiten Trägerstrom suspendierten Partikel (5).

- 30 3. Mikrofluidisches System nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** der erste Trägerstrom und der zweite Trägerstrom in dem Prozessraum (3) zumindest in einem stromaufwärts gelegenen Untersuchungsbereich nebeneinander verlaufen.

4. Mikrofluidisches System nach Anspruch 2 und 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die erste Messstation (9) in dem Untersuchungsbereich des Prozessraums (3) im Bereich des ersten Trägerstroms angeordnet ist, während die zweite Messstation (10) in dem Untersuchungsbereich des Prozessraums (3) im Bereich des zweiten Trägerstroms und bezüglich der Strömungsrichtung neben der ersten Messstation (9) angeordnet sind.

5. Mikrofluidisches System nach Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** in dem Untersuchungsbereich des Prozessraums (3) eine Trennwand (8) zwischen dem ersten Trägerstrom und dem zweiten Trägerstrom angeordnet ist, wobei die Trennwand (8) für die Partikel (4, 5) und/oder für die Trägerströme undurchlässig ist.

6. Mikrofluidisches System nach einem der Ansprüche 3 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** in dem Prozessraum (3) ein dielektrophoretischer Feldkäfig (12) angeordnet ist, um die Partikel (4, 5) zu fixieren.

7. Mikrofluidisches System nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Feldkäfig (12) stromabwärts hinter der ersten Messstation (9) und der zweiten Messstation (10) angeordnet ist.

8. Mikrofluidisches System nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Feldkäfig (12) in dem Prozessraum (3) im Wesentlichen mittig zwischen den beiden Trägerströmen angeordnet ist.

9. Mikrofluidisches System nach einem der Ansprüche 6 bis 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** in Strömungsrichtung zwischen den Messstationen (9, 10) und dem Feldkäfig (12) eine Selekt-

tionseinheit (11) angeordnet ist, die bestimmte Partikel (4, 5) aus dem ersten Trägerstrom und/oder aus dem zweiten Trägerstrom selektiert und dem Feldkäfig (12) zuführt.

5 10. Mikrofluidisches System nach einem der Ansprüche 6 bis 9, **gekennzeichnet durch** eine dritte Messstation (13) zur Untersuchung der in dem Feldkäfig (12) fixierten Partikel.

10 11. Mikrofluidisches System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** in der ersten Trägerstromzuleitung (1) und/oder in der zweiten Trägerstromzuleitung (2) und/oder in dem Prozessraum (3) mindestens eine Zentriereinheit (6, 7) angeordnet ist, welche die Partikel (4, 5) zentriert.

15

20 12. Mikrofluidisches System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** in der ersten Trägerstromzuleitung (1) und/oder in der zweiten Trägerstromzuleitung (2) und/oder in dem Prozessraum (3) mindestens eine Halteeinheit (18, 19) angeordnet ist, welche die Partikel (4, 5) festhält.

25 13. Mikrofluidisches System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** aus dem Prozessraum (3) mindestens eine zweite Trägerstromausgangsleitung (16) ausmündet.

30 14. Mikrofluidisches System nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** im stromabwärts gelegenen Bereich des Prozessraums (3) eine Sortiereinheit (14) angeordnet ist, welche die Partikel (4, 5) auf die erste Trägerstromausgangsleitung (15) oder auf die zweite Trägerstromausgangsleitung (16) sortiert.

15. Mikrofluidisches System nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die zweite Trägerstromausgangsleitung (16) in einer Strömungslinie hinter dem Feldkäfig (12) aus dem Prozessraum (3) ausmündet, während die zweite Trägerstromausgangsleitung (15) seitlich versetzt aus dem Prozessraum (3) ausmündet.

16. Mikrofluidisches System nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** aus dem Prozessraum (3) eine dritte Trägerstromausgangsleitung (17) ausmündet, wobei die dritte Trägerstromausgangsleitung (17) gegenüber der Strömungslinie hinter dem Feldkäfig (12) seitlich versetzt aus dem Prozessraum (3) ausmündet.

17. Mikrofluidisches System nach einem der Ansprüche 9 bis 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zentriereinheit (6, 7), die Sortiereinheit (14), die Selektionseinheit (11) und/oder die Halteeinheit eine dielektrophoretische Elektrodenanordnung aufweist.

18. Mikrofluidisches System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** in mindestens einer der Trägerstromausgangsleitungen (15, 16, 17) eine Halteeinheit (20) angeordnet ist, um die Partikel (4, 5) in der Ausgangsleitung (16) zwischenzuspeichern.

19. Zellfusionierer mit einem mikrofluidischen System nach einem der vorhergehenden Ansprüche.

20. Zellsortierer mit einem mikrofluidischen System nach einem der vorhergehenden Ansprüche.

21. Betriebsverfahren für ein mikrofluidisches System, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 18, mit den folgenden Schritten:

- Zuführung eines ersten Trägerstroms mit darin suspendierten Partikeln (4) durch eine erste Trägerstromzuleitung (1) in einen Prozessraum (3) des mikrofluidischen Systems,
- Untersuchung, Beobachtung, Manipulation und/oder Selektion der Partikel (4) in dem Prozessraum (3),
- Abführen mindestens eines Teiles des ersten Trägerstroms mit den darin suspendierten Partikeln (4) durch eine erste Trägerstromausgangsleitung (15),

gekennzeichnet durch folgenden Schritt:

- Zuführung mindestens eines zweiten Trägerstroms mit darin suspendierten Partikeln (5) durch eine zweite Trägerstromzuleitung (2) in den Prozessraum (3).

22. Betriebsverfahren nach Anspruch 21, **gekennzeichnet durch** folgende Schritte:

- Untersuchung der in dem ersten Trägerstrom suspendierten Partikel (4) und
- Untersuchung der in dem zweiten Trägerstrom suspendierten Partikel (5).

23. Betriebsverfahren nach Anspruch 22, **gekennzeichnet durch** folgenden Schritt:

- Selektion der in dem ersten Trägerstrom suspendierten Partikel (4) oder der in dem zweiten Trägerstrom suspendierten Partikel (5) in Abhängigkeit von der Untersuchung der in dem ersten Trägerstrom suspendierten Partikel (4) und/oder in Abhängigkeit von der Untersuchung der in dem zweiten Trägerstroms suspendierten Partikel (5).

24. Betriebsverfahren nach Anspruch 23, **gekennzeichnet durch** folgenden Schritt:

- Fixierung der selektierten Partikel (4, 5) in einem dielektrophoretischen Feldkäfig (12).

25. Betriebsverfahren nach Anspruch 24, **gekennzeichnet**

5 **durch** folgenden Schritt:

- Untersuchung der in dem Feldkäfig (12) fixierten Partikel (4, 5).

26. Betriebsverfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 25,

10 **gekennzeichnet durch** folgenden Schritt:

- Sortierung der Partikel (4, 5) auf eine von mehreren Trägerstromausgangsleitungen (15, 16, 17).

27. Betriebsverfahren nach Anspruch 26, **dadurch gekenn-**

15 **zeichnet, dass** die Sortierung in Abhängigkeit von der Untersuchung der in dem Feldkäfig (12) fixierten Partikel (4, 5) erfolgt.

28. Betriebsverfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 27,

20 **dadurch gekennzeichnet, dass** die Untersuchung der in dem ersten Trägerstrom suspendierten Partikel (4) und/oder die Untersuchung der in dem zweiten Trägerstrom suspendierten Partikel (5) und/oder die Untersuchung der in dem Feldkäfig (12) fixierten Partikel (4, 5) eine Durchlichtmessung und/oder eine Fluoreszenzmessung umfasst.

29. Betriebsverfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 28,

30 **dadurch gekennzeichnet, dass** die in der ersten Trägerstromzuleitung angeordnete Zentriereinheit und/oder Halteeinheit einerseits und die in der zweiten Trägerstromzuleitung angeordnete Zentriereinheit und/oder Halteeinheit andererseits zeitlich koordiniert angesteuert werden.

* * * * *

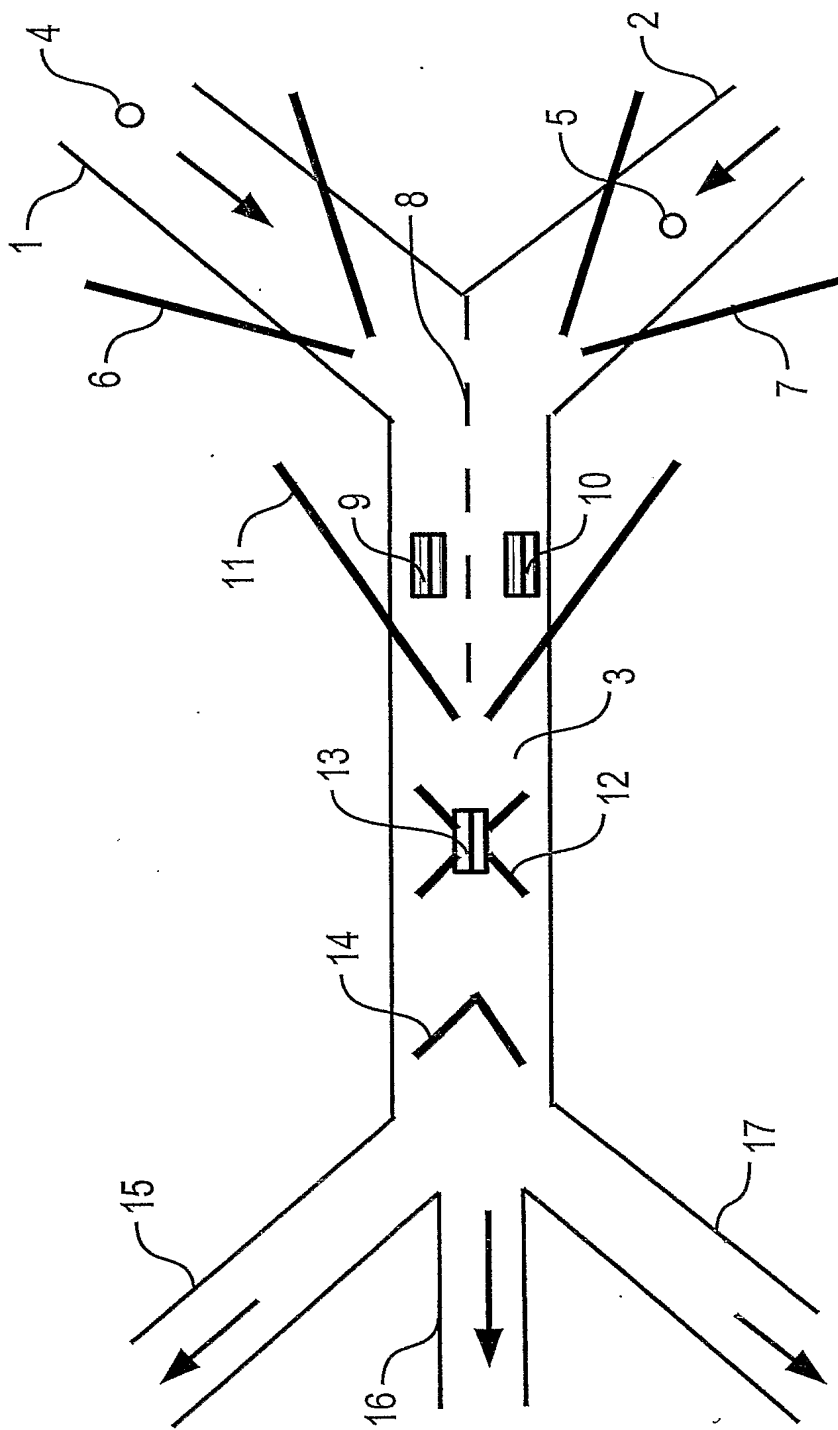
Mikrofluidisches System und zugehöriges Betriebsverfahren

5

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein mikrofluidisches System, insbesondere in einem Zellsortierer, mit einer ersten Trägerstromzuleitung (1) zur Zuführung eines ersten Trägerstroms mit darin suspendierten Partikeln (4), einer ersten Trägerstromausgangsleitung (15) zum Abführen mindestens eines Teils des Trägerstroms mit den darin suspendierten Partikeln (4), einem Prozessraum (3) zur Untersuchung, Beobachtung, Manipulation und/oder Selektion der Partikel (4), wobei die erste Trägerstromzuleitung (1) in den Prozessraum (3) einmündet, während die erste Trägerstromausgangsleitung (15) aus dem Prozessraum (3) ausmündet. Es wird vorgeschlagen, dass in den Prozessraum (3) mindestens eine zweite Trägerstromzuleitung (2) einmündet, um einen zweiten Trägerstrom mit darin suspendierten Partikeln (5) zuzuführen. Weiterhin umfasst die Erfindung ein entsprechendes Betriebsverfahren.

(Figur 1)



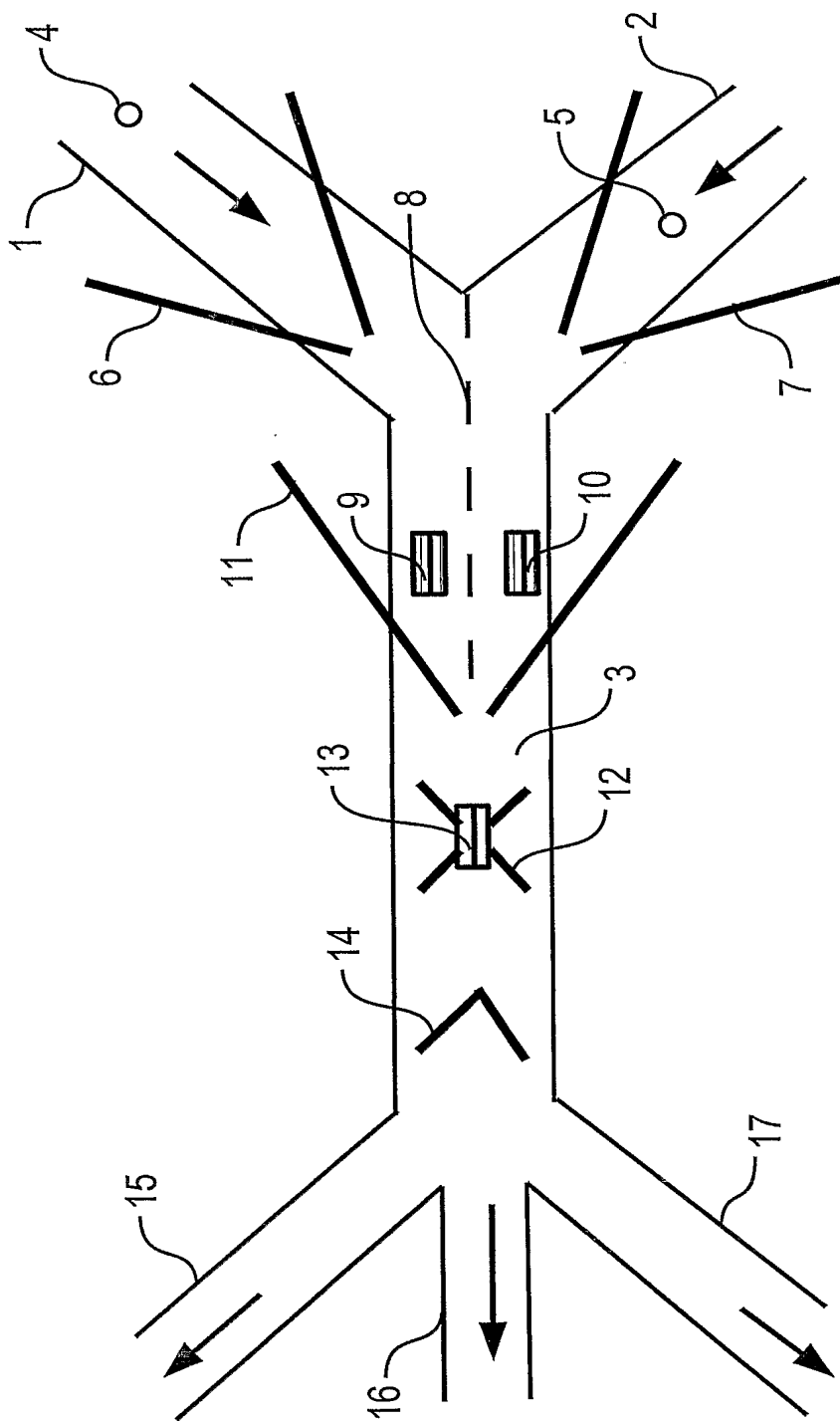


FIG 1

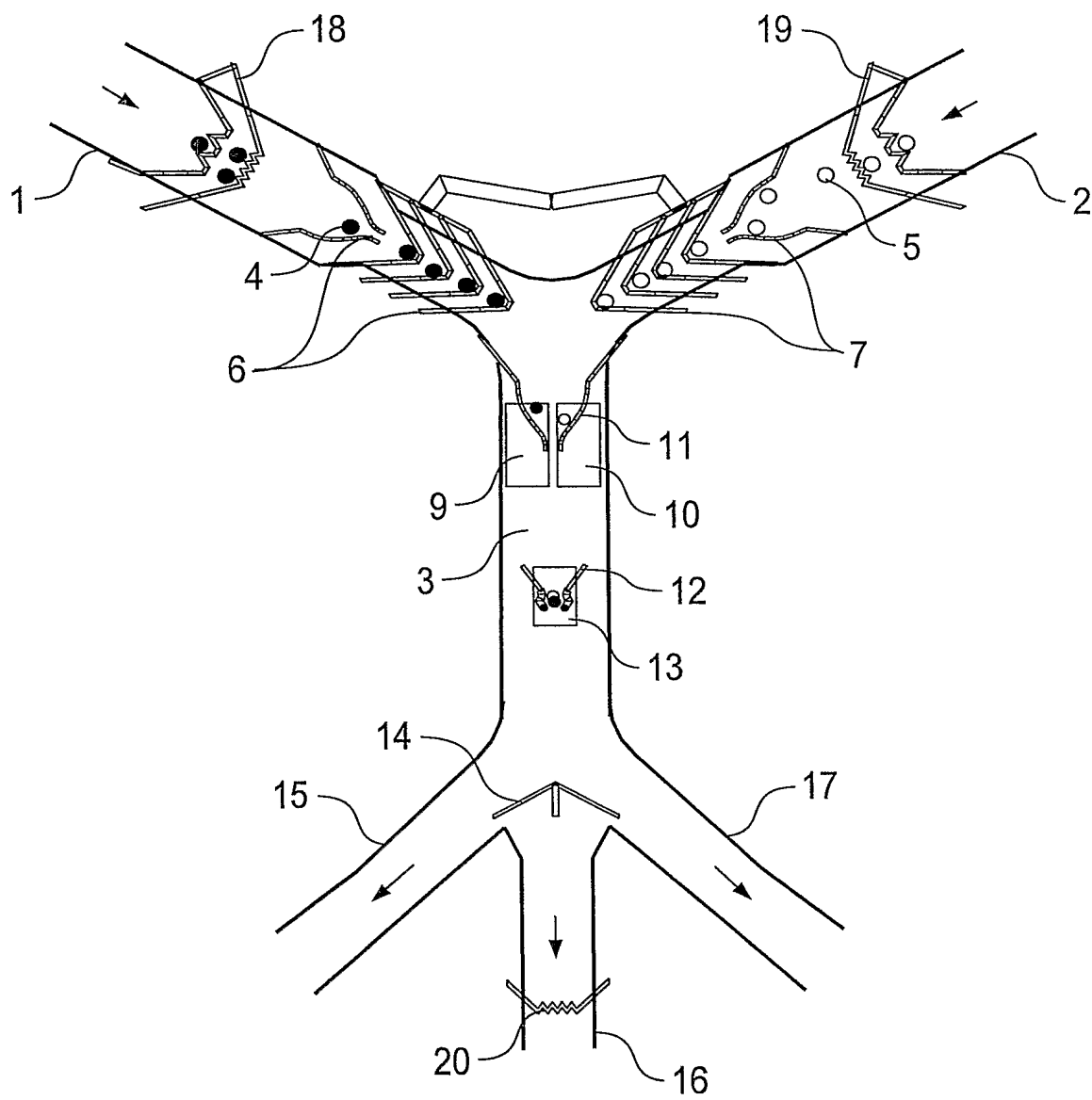


FIG 2